

# The hypercoagulable state in patients : determining (hyper)coagulability and the role of thrombin generation

Citation for published version (APA):

Dielis, A. W. (2009). *The hypercoagulable state in patients : determining (hyper)coagulability and the role of thrombin generation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20090603ad>

## Document status and date:

Published: 01/01/2009

## DOI:

[10.26481/dis.20090603ad](https://doi.org/10.26481/dis.20090603ad)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## **Chapter 7.1**

### **General discussion, summary and conclusions**



## Coagulation- versus fibrinolysis-dependent hypercoagulability

Thrombosis is an important cause of morbidity and mortality worldwide, with an increasing incidence of (especially) arterial thrombotic disease.<sup>1</sup> Whether venous or arterial, thrombosis is characterized by, and results from an underlying hypercoagulable state. Although the contributing risk factors may differ between the different thrombotic disorders (acute myocardial infarction, cerebrovascular accident, deep venous thrombosis, pulmonary embolism), they all result in blood that is more prone to excessive thrombus formation, also known as the hypercoagulable state of blood.<sup>2,3</sup> Essentially, a dysbalance between coagulation and fibrinolysis is created.<sup>4</sup>

In the last decades, many studies have been conducted to characterize factors (both biochemical and lifestyle-related)<sup>5,6</sup> that contribute to hypercoagulability. Besides well-known risk factors such as smoking, age and body weight, arterial and venous thrombosis are mainly associated with changes in coagulation-related biochemical markers (including soluble plasma tissue factor,<sup>7</sup> antithrombin,<sup>8,9</sup> prothrombin,<sup>10</sup> FVIII<sup>11-13</sup>) that enhance coagulation activity. In contrast to a hypercoagulable state that results from an increased coagulation potential, hypercoagulability may also arise from a decrease in fibrinolytic activity.<sup>14</sup> Hypertension is an example of such fibrinolysis-dependent hypercoagulability.<sup>15</sup> These differences in underlying mechanisms of hypercoagulability warrant different, specific screening methods and treatments that are focused on restoring the dysbalance between coagulation and fibrinolysis. In this thesis we therefore make a clear distinction between 1. *Coagulation-dependent hypercoagulability* and 2. *Fibrinolysis-dependent hypercoagulability*, and the presentation of studies in this thesis is structured accordingly.

## Optimization and validation of the thrombin generation technique

The main part of this thesis focuses on thrombin generation as a tool to probe the coagulation potential in plasma samples from several patients with thrombotic disease. In Chapter 3 we present studies on the validation of the Calibrated Automated Thrombogram in our laboratory. Many studies have been published on establishing normal ranges of thrombin generation parameters, but these studies are difficult to compare because of the different test systems used, with different initiator sources and concentrations, the variety in phospholipids used and variations in plasma preparation.<sup>16-22</sup> In addition, several software packages available to calculate thrombin generation parameters use different definitions for these parameters. Recent papers by Van Veen *et al.*<sup>19</sup> and Dargaud *et al.*<sup>20</sup> confirm the poor comparability of thrombin generation in identical samples between institutes, with variances reaching almost 40% (for endogenous thrombin potential).

For our patient studies we chose a commercially available technique<sup>23</sup> and we used

the accompanying reagents to ensure optimal comparability. To establish a reference range and inter- and intra-assay variations of the Calibrated Automated Thrombogram in our laboratory we studied plasma samples from 139 healthy volunteers. Furthermore, we repeatedly sampled plasma from 33 healthy individuals with intervals of six weeks, 12 weeks and one year. Thrombin generation analyses were repeated after five and nine months. To our surprise the thrombin generation assay did not provide stable results over time (showing a decrease in endogenous thrombin potential after five months, only to restore after nine months). Because the pre-analytical conditions did not change, differences were likely to result from unstable reagents. A similar shift in thrombin generation parameters was observed in pooled normal plasma that was included in all analyses as an internal control. If thrombin generation parameters were expressed as percentages relative to pooled normal plasma (set at 100%) rather than as nM of thrombin production, the observed temporal changes were eliminated. With this normalization intra- and inter-assay variations were acceptable at values below 8% for the latter. The results presented in Chapter 3.1 therefore advocate the necessity of normalization of thrombin generation results. A similar recommendation was given by Dargaud *et al.*<sup>20</sup> in the aforementioned paper.

Thrombin generation does not only provide an overall measure of coagulation potential, but analysis of the individual parameters that can be derived from the thrombin generation curve can provide information on specific phases of coagulation. Lag time reflects the initiation phase, while the peak height, time to peak and slope represent the propagation phase of coagulation. The termination phase is represented by the time to the start of the tail. The endogenous thrombin potential corresponds to the total amount of thrombin formed and incorporates all of the aforementioned phases. During these phases, pro- and anticoagulant proteins have differential activities and their relative contributions to the corresponding thrombin generation parameters were studied in healthy individuals as described in Chapter 3.2. We measured coagulation factors and factors of the protein C system and employed multiple regression analysis to establish the determinants of thrombin generation. In order to achieve a more specific reflection of the activity of the protein C system we primed the assays by adding thrombomodulin and activated protein C. Major contributors to the lag time were plasma levels of fibrinogen, FVII, free protein S and free tissue factor pathway inhibitor. Main determinants of the endogenous thrombin potential and peak height were fibrinogen, free tissue factor pathway inhibitor and antithrombin. At high tissue factor concentrations FV was an additional determinant, and FXII at low tissue factor concentrations.

These results, however, should be cautiously approached because our study group consisted of healthy individuals with normal coagulation factor levels and relatively narrow variations. Moreover, the statistical method used (multiple linear regression analysis) does not allow direct extrapolation to patients with (an increased risk for) thrombotic disease. A similar approach of exploration of the determinants in plasma

samples from several patient groups would provide valuable information and would help putting these results in perspective.

A hot topic in the field of research involving thrombin generation is the contribution of the intrinsic coagulation or contact activation system.<sup>24,25</sup> Indeed, plasma assayed in the absence of an initiator of the extrinsic pathway, but in the presence of calcium and phospholipids, can display generation of thrombin after incubation for approximately 20 minutes. In the presence of a sufficient tissue factor concentration contact activation is less likely to have pronounced effects but its role at low concentrations of tissue factor is controversial. In our determinants study FXII was found to be significantly associated with the endogenous thrombin potential and peak height in the 1 pM tissue factor assay but this effect was absent at the (much) higher tissue factor concentration of 13.6 pM. Others have reported moderate to pronounced effects of the intrinsic pathway. It was unclear whether FXII activation occurred during the measurements, or resulted from blood sampling that generated trace amounts of activated FXII. Although FXIIa is rapidly bound to its major inhibitor C1-esterase inhibitor, downstream activation of FXI could already have occurred.

The influence of contact activation may be overcome by the addition of corn trypsin inhibitor to the plasma,<sup>26</sup> but the question remained if it should be added to the blood drawing tubes prior to sampling, or during plasma preparation or the actual thrombin generation measurement. In Chapter 3.3 we explored this topic by sampling blood from healthy individuals and we varied blood drawing techniques, adding corn trypsin inhibitor during different stages, and we measured thrombin generation at varying amounts of tissue factor and kaolin concentrations. In thrombin generation assays that were triggered with 0.5 pM tissue factor or higher the addition of corn trypsin inhibitor to plasma did not significantly influence thrombin generation measurements. Addition of corn trypsin inhibitor in blood collection tubes prior to sampling did not influence measurements triggered with 1 pM tissue factor or higher. Although peak height in the presence of corn trypsin inhibitor was lower, the observed differences were within the inter-assay variations. Given these results and practical considerations (including additional costs of more than €15 per tube), we recommend no addition of corn trypsin inhibitor in thrombin generation assays with 1 pM tissue factor initiation or higher.

In conclusion, our recommendations to ensure optimal reproducibility and comparability within and between study centers are:

1. No addition of corn trypsin inhibitor to thrombin generation assays triggered with tissue factor in a concentration of 1 pM or higher;
  2. Standardized blood collection and plasma preparation, including two-step centrifugation to remove microparticles from the plasma;
  3. Use of commercially available and standardized reagents (including phospholipids and thrombin generation initiator);
  4. Normalization of non-time dependent thrombin generation parameters (endogenous thrombin potential and peak height) against pooled normal plasma.
-

---

## Coagulation-dependent hypercoagulability – the clinical application of thrombin generation

Representation of coagulation activity or potential would be useful in patients with thrombotic disease to get a general overview of their current state of coagulability and could possibly be translated in an actual risk predictor. In this respect, several studies have attempted to estimate coagulation activity in patient plasma samples. Initial studies focused on measurements of prothrombin fragment 1+2 as a marker of the conversion of prothrombin to thrombin,<sup>28-31</sup> and complexes of thrombin and antithrombin.<sup>28,32,33</sup> Likewise, D-dimer levels reflect ongoing fibrinolysis following the formation of thrombi.<sup>28,32,33</sup>

In patient studies, risks for acute myocardial infarction, cerebrovascular accident and deep venous thrombosis were (generally) positively associated with the aforementioned laboratory markers, although some studies showed conflicting data.<sup>9,28-34</sup> A limitation of most studies is their retrospective nature, that they did not take outcome parameters into account, and that it is difficult to distinguish whether the observed changes in coagulability are either a cause or an effect of the thrombotic disease. More recently, D-dimer levels have been studied prospectively in deep venous thrombosis patients and several authors provided evidence that patients with persistently increased D-dimer levels are at higher risk for recurrent disease.<sup>35,36</sup>

Application of the thrombin generation technique to reflect overall coagulation in these patients was the inevitable next step, but there is a subtle yet very important difference from the aforementioned markers of coagulation. While prothrombin fragment 1+2, thrombin-antithrombin complexes and D-dimer reflect *actual* ongoing coagulation, thrombin generation provides an indication of the activity that could *potentially* occur should the coagulation cascade be activated. In fact, endogenous thrombin potential (as the most intensively studied thrombin generation parameter) was found to be negatively correlated with prothrombin fragment 1+2 (albeit in pediatric patients with congenital heart disease),<sup>37</sup> but was increased in patients after acute myocardial infarction.<sup>38</sup>

Our study in patients with acute myocardial infarction (Chapter 4.1) was conducted to utilize the thrombin generation assay as a risk predictor of outcome. Plasma samples were drawn during the acute phase of the infarction (before initiation of therapy) and patients were followed-up for 12 months and relevant clinical outcome was recorded. In agreement with previous studies overall thrombin generating potential was increased during the infarction, and was persistently increased six months later. Endogenous thrombin potential measured on admission was, surprisingly, significantly associated with outcome in an inverse manner. Patients with low thrombin generation were at

higher risk to develop a recurrent infarction or stroke, and at a higher risk of cardiovascular death.

We hypothesized three opposing mechanisms explaining this finding: 1. consumption of thrombin resulting in a decreased thrombin generation potential; 2. low thrombin generation response (together with decreased thrombomodulin in atherosclerosis) causing insufficient activation of the protein C system; 3. upregulation of antithrombotic proteins. Consumption of thrombin, however, is not very likely because of the relatively small and acute thrombotic process in comparison to deep venous thrombosis, for example. Although thrombin generation in general was increased in these patients compared to healthy individuals (Chapter 4.2), due to the study design we did not have samples to confirm the absence of thrombin consumption in the acute phase of thrombosis. In acute myocardial infarction patients, in addition, thrombin generation was not correlated with prothrombin fragment 1+2, and thus does not provide a direct link between *actual* prothrombin activation and thrombin *potential*. Lastly, thrombin generation may actually be increased, but upregulation of antithrombotic proteins could influence the test results. From the determinants study (Chapter 3.2) it can be appreciated that tissue factor pathway inhibitor is a particular strong suppressor of the thrombin generation parameters and it has been published (although *in vitro*) that endothelial cells release tissue factor pathway inhibitor in the presence of thrombin.<sup>39</sup> A repetition of the determinants study presented in Chapter 3.2 in patients with acute myocardial infarction could shed light on this suprising, but interesting, data.

In contrast to the results obtained in patients with acute myocardial infarction, increased thrombin generation was associated with recurrence of deep venous thrombosis (Chapter 4.3). Interestingly, while thrombin generation was persistently increased during follow-up for a total of two years, the last plasma sample taken before the recurrence showed a further increase. When the plasma was assayed in the presence of thrombomodulin, the reduction in thrombin generation that could be achieved was significantly less in patients with a recurrence during follow-up, suggesting resistance to thrombomodulin in these plasmas. While thrombin generation in the absence of thrombomodulin was associated with known risk factors such as residual thrombosis,<sup>40</sup> previous thrombosis, age<sup>41</sup> and FV Leiden,<sup>42</sup> addition of thrombomodulin removed such associations and could therefore serve as an additional risk factor besides these known risk factors.

## **Fibrinolysis-dependent hypercoagulability – targeting the renin-angiotensin system**

The fibrinolysis-dependent hypercoagulability that is present in hypertension is presented in Chapter 5.1. The renin-angiotensin system is the predominantly involved

---



system that links blood pressure and fibrinolysis, or rather the inhibition of fibrinolysis.<sup>43</sup> Increased angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor type-1 release upon stimulation of the angiotensin II receptor type-1, and this results in hypofibrinolysis – and thus relative hypercoagulability.<sup>43,44</sup> In addition, there is evidence (*in vitro*) that tissue factor is upregulated and expressed on the endothelial surface,<sup>45</sup> further disturbing the balance between coagulation and fibrinolysis. In apparent contradiction is the finding that high tissue-type plasminogen activator antigen is associated with an increased risk for arterial thrombotic disease,<sup>46</sup> but this effect is most likely the result of increased complex formation with the upregulated plasminogen activator inhibitor type-1 because this complex has a slower clearance than free (active) tissue-type plasminogen activator.<sup>47</sup>

From this, it can be hypothesized that administration of antihypertensive medication that influences the renin-angiotensin system may ameliorate the level of fibrinolytic activity, and this effect may be present regardless of changes in blood pressure. We tested this hypothesis by administering the angiotensin II receptor blocker eprosartan in a non-pressor dose to therapy-resistant hypertensive patients undergoing renal artery angiography (Chapter 5.2). Indeed, eprosartan resulted in a sharp decrease in plasminogen activator inhibitor type-1 activity and tissue-type plasminogen activator antigen, with a concomitant increase in activity of the latter. Although these effects of angiotensin II receptor blockers have been described before, we were able to demonstrate that this effect also occurs in therapy-resistant hypertension in the absence of changes in blood pressure. Given these results it is tempting to recommend this class of medication to all hypertensive patients, but because our study only focused on short-term effects, the effects on restoration of fibrinolytic activity on the longer term should be investigated. In addition, it is unclear whether these effects translate into a decreased incidence of thrombotic complications of hypertension.

## **Coagulation-modifying medication and the effects on thrombin generation**

While thrombin generation measurements are useful to determine the potential activity of coagulation in patients, treatment that influences this coagulation activity obviously also alters thrombin generation. Examples of anticoagulant treatment that influence thrombin generation are low molecular weight heparin (as described in Chapter 4.1) and vitamin K antagonists (Chapter 4.2). A study focusing on the effects of procoagulant treatment (FVIII administration in haemophilia A patients) is presented in Chapter 6.

Haemophilia A is characterized by decreased levels of FVIII and this results in a bleeding tendency. Thrombin generation has been shown to reflect this haemorrhagic tendency in patients,<sup>48,49</sup> while increased FVIII levels reflect a procoagulant state.<sup>50</sup> Administration of (procoagulant) recombinant FVIII to haemophilia A patients restores

this hypocoagulability and this is reflected in normalization of thrombin generation measurements upon FVIII infusion. Although FVIII levels in plasma are correlated with the incidence of bleedings, there is a wide inter-individual variation indicating that other components of coagulation are involved besides FVIII. In agreement with this observation are previously published studies in which parameters of thrombin generation and FVIII were correlated. These studies again showed wide inter-individual variations in thrombin generation parameters at comparable FVIII plasma levels.<sup>51</sup>

We studied thrombin generation during 48 hours after recombinant FVIII administration and we were able to confirm the aforementioned findings. In addition, we hypothesized that addition of thrombomodulin to the Calibrated Automated Thrombogram results in an assay that may better reflect FVIII levels because thrombomodulin-induced reduction of thrombin generation is dependent on plasma levels of FV and FVIII. Since FV levels are not expected to show significant changes during the 48 hours of the study protocol, changes in the observed reductions in the presence of thrombomodulin are expected to be predominantly dependent on FVIII levels. Multiple linear regression analysis incorporating thrombin generation parameters measured in the presence of thrombomodulin indeed resulted in a moderately better reflection of plasma FVIII levels. Whether this results in a clinically relevant method for screening bleeding tendency remains to be established in a prospective study.

## **Relevance for thrombin generation measurements in a laboratory setting**

This thesis provides results from studies on optimization, standardization and sensitivity for coagulation-influencing therapy of the Calibrated Automated Thrombogram as a technique to measure thrombin generation. Subsequent recommendations on plasma sample collection and preparation, use of reagents and expression of thrombin generation results are given. In addition, the contribution of pro- and anticoagulant proteins on parameters of the thrombin generation curve are explored. These results and recommendations are a first effort to standardize thrombin generation measurements to be able to compare results between laboratories and promote (international) cooperation on thrombin generation research.

## **Relevance of determining (hyper)coagulability for clinical practice**

This thesis presents studies in patients with coagulation- and fibrinolysis-dependent hypercoagulability in whom parameters that reflect activity of either coagulation or fibrinolysis were determined, including measurements of thrombin generation. The results of the presented studies on associations between thrombin generation and clinical outcome after arterial and venous thrombosis provide a starting point for further research focusing on the use of thrombin generation measurements on actual clinical decision making, based on a patient's state of hypercoagulability. Likewise, the presented study on the renin-angiotensin system as a target to reduce hypercoagulability in therapy-resistant hypertension serves as a basis for prospective intervention studies looking into possible benefits from a more hypercoagulability-specific approach.

## References

1. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N *et al.*; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics: 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2008;117:e25–e146.
2. Nachman RL, Silverstein R. Hypercoagulable states. *Ann Intern Med*. 1993;119:819–827.
3. Schafer AI, Levine MN, Konkle BA, Kearon C. Thrombotic disorders: diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:520–539.
4. Gaffney PJ, Edgell TA, Whitton CM. The haemostatic balance – Astrup revisited. *Haemostasis*. 1999;29:58–71.
5. Chiuve SE, McCullough ML, Sacks FM, Rimm EB. Healthy lifestyle factors in the primary prevention of coronary heart disease among men. *Circulation*. 2006;114:160–167.
6. Stampfer MJ, Hu FB, Manson JE, Rimm EB, Willett WC. Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle. *N Engl J Med*. 2000;343:16–22.
7. Seljeflot I, Hurlen M, Hole T, Arnesen H. Soluble tissue factor as predictor of future events in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Res*. 2003;111:369–372.
8. Van der Putten RF, Glatz JF, Hermens WT. Plasma markers of activated hemostasis in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta*. 2006;371:37–54.
9. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*. 2008;112:19–27.
10. Chinthammitr Y, Vos HL, Rosendaal FR, Doggen CJ. The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case-control study. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2587–2592.
11. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B *et al.* High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2000;343:457–462.
12. Legnani C, Cini M, Cosmi B, Poggi M, Boggian O, Palareti G. Risk of deep venous thrombosis: interaction between oral contraceptives and high factor VIII levels. *Haematologica*. 2004;89:1347–1351.
13. Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, Hamulyák K, van Pampus EC, Koopman MM *et al.* Elevated levels of FVIII:C within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2005;3:97–84.
14. Spronk HM, Govers-Riemslog JW, ten Cate H. The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays*. 2003;25:1220–1228.
15. Fogari R, Zoppi A. Antihypertensive drugs and fibrinolytic function. *Am J Hypertens*. 2006;19:1293–1299.
16. De Smedt E, Al Dieri R, Spronk HM, Hamulyák K, ten Cate H, Hemker HC. The technique of measuring thrombin generation with fluorogenic substrates: 1. Necessity of adequate calibration. *Thromb Haemost*. 2008;100:343–349.
17. Duchemin J, Pan-Petes B, Arnaud B, Blouch MT, Abgrall JF. Influence of the coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Haemost*. 2008;99:767–773.

18. Van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC, Kitchen S, Makris M. Between-batch variation of calibrator activity can significantly influence fluorogenic measurement of thrombin generation. *J Thromb Haemost.* 2006;4:2514–2516.
19. Van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol.* 2008;142:889–903.
20. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Negrier C, Lecompte T, Petros S *et al.* Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study. *Br J Haematol.* 2007;139:303–309.
21. Devreese K, Wijns W, Combes I, Van Kerckhoven S, Hoylaerts MF. Thrombin generation in plasma of healthy adults and children: chromogenic versus fluorogenic thrombogram analysis. *Thromb Haemost.* 2007;98:600–613.
22. Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, Zach D, Muntean W. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost.* 2006;95:772–775.
23. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R *et al.* The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32:249–253.
24. Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1954–1959.
25. Van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC, Kitchen S, Bowyer AE, Makris M. Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombin-generation measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008;19:183–189.
26. Ramström S. Clotting time analysis of citrated blood samples is strongly affected by the tube used for blood sampling. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005;16:447–452.
27. Ota S, Wada H, Abe Y, Yamada E, Sakaguchi A, Nishioka J *et al.* Elevated levels of prothrombin fragment 1+2 indicate high risk of thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2008;14:279–285.
28. Agewall S, Wikstrand J, Fagerberg B. Prothrombin fragment 1+2 is a risk factor for myocardial infarction in treated hypertensive men. *J Hypertens.* 1998;16:537–541.
29. Cooper JA, Miller GJ, Bauer KA, Morrissey JH, Meade TW, Howarth DJ *et al.* Comparison of novel hemostatic factors and conventional risk factors for prediction of coronary heart disease. *Circulation.* 2000;102:2816–2822.
30. Côté R, Wolfson C, Solymoss S, Mackey A, Leclerc JR, Simard D *et al.* Hemostatic markers in patients at risk of cerebral ischemia. *Stroke.* 2000;31:1856–1862.
31. Kyrle PA, Eichinger S, Pabinger I, Stümpflen A, Hirschl M, Bialonczyk C *et al.* Prothrombin fragment F1+2 is not predictive for recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 1997;77:829–833.
32. Lowe GD, Rumley A, Sweetnam PM, Yarnell JW, Rumley J. Fibrin D-dimer, markers of coagulation activation and the risk of major ischaemic heart disease in the Caerphilly study. *Thromb Haemost.* 2001;86:822–827.
33. Oldgren J, Linder R, Grip L, Siegbahn A, Wallentin L. Coagulation activity and clinical outcome in unstable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1059–1064.

- 
34. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Valdres L, Lunghi B, Bernardi F *et al.* Predictive value of D-dimer test for recurrent venous thromboembolism after anticoagulation withdrawal in subjects with a previous idiopathic event and in carriers of congenital thrombophilia. *Circulation*. 2003;108:313–318.
  35. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Guazzaloca G, Pancani C, Coccheri S. Risk of venous thromboembolism recurrence: high negative predictive value of D-dimer performed after oral anticoagulation is stopped. *Thromb Haemost*. 2002;87:7–12.
  36. Legnani C, Palareti G, Cosmi B, Cini M, Tosetto A, Tripodi A; PROLONG Investigators (FCSA and Italian Federation of Thrombosis Centers). Different cut-off values of quantitative D-dimer methods to predict the risk of venous thromboembolism recurrence: a post-hoc analysis of the PROLONG study. *Haematologica*. 2008;93:900–907.
  37. Koestenberger M, Cvirn G, Nagel B, Rosenkranz A, Leschnik B, Gamillscheg A *et al.* Thrombin generation determined by calibrated automated thrombography (CAT) in pediatric patients with congenital heart disease. *Thromb Res*. 2008;122:13–19.
  38. Van der Putten RF, Glatz JF, Hermens WT. Plasma markers of activated hemostasis in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta*. 2006;371:37–54.
  39. Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:233–242.
  40. Young L, Ockelford P, Milne D, Rolfe-Vyson V, Mckelvie S *et al.* Post-treatment residual thrombosis increases the risk of recurrent deep vein thrombosis and mortality. *J Thromb Haemost*. 2006;4:1919–1924.
  41. Baglin T, Palmer CR, Luddington R, Baglin C. Unprovoked recurrent venous thrombosis: prediction by D-dimer and clinical risk factors. *J Thromb Haemost*. 2008;6:577–582.
  42. Marchiori A, Mosena L, Prins MH, Prandoni P. The risk of recurrent venous thromboembolism among heterozygous carriers of factor V Leiden or prothrombin G20210A mutation. A systematic review of prospective studies. *Haematologica*. 2007;92:1107–1114.
  43. Brown NJ, Agirbasli MA, Williams GH, Litchfield WR, Vaughan DE. Effect of activation and inhibition of the renin-angiotensin system on plasma PAI-1. *Hypertension*. 1998;32:965–971.
  44. Lip GY. Hypertension and the prothrombotic state. *J Hum Hypertens*. 2000;14:687–690.
  45. Mehta JL, Li DY, Yang H, Raizada MK. Angiotensin II and IV stimulate expression and release of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human coronary artery endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39:789–794.
  46. Goodfield NE, Newby DE, Ludlam CA, Flapan AD. Effects of acute angiotensin II type-1 receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition on plasma fibrinolytic parameters in patients with heart failure. *Circulation*. 1999;99:2983–2985.
  47. Brown NJ, Kumar S, Painter CA, Vaughan DE. ACE inhibition versus angiotensin type-1 receptor antagonism: differential effects on PAI-1 over time. *Hypertension*. 2002;40:859–865.
  48. Beltran-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia*. 2005;11:326–334.
  49. Trossaert M, Regnault V, Sigaud M, Boisseau P, Fressinaud E, Lecompte T. Mild haemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. *J Thromb Haemost*. 2008;6:486–493.
-

50. Siegemund A, Petros S, Siegemund T, Scholz U, Seyfarth HJ, Engelmann J. The endogenous thrombin potential and high levels of coagulation factor VIII, factor IX and factor XI. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004;15:241–244.
51. Lewis SJ, Stephens E, Florou G, Macartney NJ, Hathaway LS, Knipping J *et al*. Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion. *Br J Hematol*. 2007;138:775–782.

## **Chapter 7.2**

### **Algemene discussie, samenvatting en conclusies**





## Stollings- versus fibrinolysegerelateerde verhoogde stollingsneiging

Trombose is een belangrijke oorzaak van ziekte en sterfte, en wereldwijd is er een toenemende incidentie van (met name) arteriële trombose.<sup>1</sup> Zowel veneuze als arteriële trombose gaat gepaard met, en ontstaat door een toestand van verhoogde stollingsneiging (hypercoagulabiliteit). Hoewel verschillende vormen van trombose (acuut myocardinfarct, herseninfarct, diepveneuze trombose, longembolie) verschillende risicofactoren kunnen hebben, leiden deze in meer of mindere mate tot bloed met een verhoogde neiging tot het vormen van bloedstolsels.<sup>2,3</sup> Feitelijk raakt het evenwicht tussen stolling en stollingsafbraak (fibrinolyse) hierdoor verstoord.<sup>4</sup>

De laatste jaren is uitgebreid onderzoek verricht om zowel biochemische als levensstijlfactoren aan te duiden die bijdragen aan deze verhoogde stollingsneiging.<sup>5,6</sup> Naast bekende risicofactoren als roken, leeftijd en overgewicht blijken arteriële en veneuze trombose voornamelijk geassocieerd met biochemische factoren die de activiteit van de stolling beïnvloeden (verhogen) of reflecteren, waaronder plasma-oplosbaar weefselfactor,<sup>7</sup> antitrombine,<sup>8,9</sup> protrombine<sup>10</sup> en FVIII.<sup>11-13</sup> Naast hypercoagulabiliteit die wordt veroorzaakt door een verhoogde activiteit van stolling kan een verhoogde stollingsneiging ook ontstaan door een afname in de activiteit van de fibrinolyse,<sup>14</sup> zoals bij hoge bloeddruk (hypertensie) het geval is.<sup>15</sup> Deze verschillende mechanismen vragen om specifieke tests en behandelingen die erop gericht zijn het verstoorde evenwicht tussen stolling en fibrinolyse te herstellen. In dit proefschrift wordt dan ook een onderscheid gemaakt tussen 1. *Stollingsgerelateerde hypercoagulabiliteit* enerzijds, en 2. *Fibrinolysegerelateerde hypercoagulabiliteit* anderzijds.

## Optimalisatie en validatie van de trombinegeneratietest

Een groot deel van dit proefschrift richt zich op de mogelijkheid om potentiële stollingsactiviteit te meten met behulp van de trombinegeneratietest in plasmasamples van patiënten met diverse vormen van trombose. In Hoofdstuk 3 worden studies besproken die zijn uitgevoerd om de *Calibrated Automated Thrombogram* techniek voor het meten van trombinegeneratie in ons laboratorium te valideren. Er zijn reeds vele studies verschenen om normaalwaarden voor trombinegeneratie vast te stellen, maar door de uiteenlopende technieken met verschillende initiatoren in verschillende concentraties en de grote diversiteit in gebruikte fosfolipiden en plasmabereiding zijn deze studies moeilijk onderling te vergelijken.<sup>16-22</sup> Bovendien gebruiken de beschikbare softwarepakketten uiteenlopende definities voor parameters die de trombinecurve beschrijven. Recentelijk bevestigden Van Veen *et al.*<sup>19</sup> en Dargaud *et al.*<sup>20</sup> de slechte onderlinge vergelijkbaarheid door identieke plasmasamples door verschillende instituten te laten meten. Dit resulteerde in variatiecoëfficiënten tot 40% (voor de

---

endogene trombinepotentialiaal).

Om optimale vergelijkbaarheid te bewerkstelligen kozen we voor onze patiëntenstudies een commercieel verkrijgbare techniek<sup>23</sup> met de bijbehorende reagentia. We gebruikten plasmasamples van 139 gezonde vrijwilligers om referentiewaarden en variatie (zowel inter- als intra-assay) van de Calibrated Automated Thrombogram techniek vast te stellen. Daarnaast werden bloedafnames herhaald bij 33 gezonde personen na zes weken, 12 weken en één jaar. Trombinegeneratiemetingen werden herhaald na vijf en negen maanden. De trombinegeneratietest bleek, geheel onverwacht, niet stabiel in de tijd: er was sprake van een afname in trombinegeneratie na vijf maanden, terwijl de meting na negen maanden vergelijkbaar was met de eerste meting. Omdat pre-analytische omstandigheden onveranderd waren, was instabiliteit van de gebruikte reagentia de waarschijnlijkste oorzaak. Dezelfde verschuiving in trombinegeneratie trad op in het normaalplasma dat bij elke meting als interne controle werd meegenomen. Wanneer trombinegeneratie van geteste samples niet in nM trombine werd uitgedrukt, maar als percentage van normaalplasma (per definitie 100%) verdween de tijdelijke variatie. Deze ‘normalisatie’ resulteerde in acceptabele variaties (zowel inter- als intra-assay) van minder dan 8%. Deze resultaten, besproken in Hoofdstuk 3.1, tonen de noodzaak van het normaliseren van resultaten van de trombinegeneratietest. Dargaud *et al.*<sup>20</sup> kwamen tot een vergelijkbare aanbeveling.

Trombinegeneratie geeft niet alleen een algemeen beeld van potentiële stollingsactiviteit, maar de afzonderlijke parameters die de trombinecurve beschrijven reflecteren specifieke fasen van de stolling. De *lag time* beschrijft de initiatiefase, de piekhoogte (*peak height*), *time to peak*, en steilheid (*slope*) geven de propagatiefase weer, en de *time to the start of the tail* beschrijft de terminatiefase. De endogene trombinepotentialiaal komt overeen met de totale hoeveelheid gegenereerd trombine en is afhankelijk van de hierboven genoemde fasen. Tijdens deze fasen spelen stollingsactiverende en -remmende eiwitten een rol, afhankelijk van de mate van activatie. Hun relatieve bijdrage aan trombinegeneratie werd bestudeerd in gezonde vrijwilligers zoals beschreven in Hoofdstuk 3.2. Om de determinanten van de trombinegeneratie vast te stellen werden stolfactoren en factoren van het proteïne C systeem gemeten en geanalyseerd met behulp van multivariate regressie. Om de test gevoeliger te maken voor de activiteit van het proteïne C systeem werden trombomoduline en geactiveerd proteïne C toegevoegd. In de analyse bleken fibrinogeen, FVII, vrij proteïne S en vrij *tissue factor pathway inhibitor* de grootste bijdragen te leveren aan de *lag time*. De endogene trombinepotentialiaal en piekhoogte werden met name bepaald door fibrinogeen, vrij *tissue factor pathway inhibitor* en antitrombine. Bij hoge weefselfactorconcentraties was FV een extra determinant, en FXII bij lage weefselfactorconcentraties.

Deze resultaten moeten zorgvuldig worden geïnterpreteerd omdat onze studiegroep uit gezonde vrijwilligers bestond met normale plasmaspiegels van stolfactoren, en

---

relatief kleine onderlinge variaties. Mede door de gebruikte statistische methode (multivariate regressieanalyse) kunnen de gevonden resultaten niet direct worden geëxtrapoleerd naar patiënten met (een verhoogd risico op) trombose. Een herhaling van deze studie in diverse groepen patiënten zou de beschreven resultaten in perspectief kunnen plaatsen.

Een veelbesproken onderwerp is de invloed van het intrinsieke stollingssysteem, of contactactivatie, op trombinegeneratie.<sup>24,25</sup> Wanneer plasma wordt geïncubeerd in aanwezigheid van calcium en fosfolipiden, maar zonder initiator van de intrinsieke stolling, kan na ongeveer 20 minuten generatie van trombine worden waargenomen. In de aanwezigheid van een voldoende hoge concentratie weefselfactor speelt contactactivatie waarschijnlijk een minder belangrijke rol, maar het effect van contactactivatie bij lage concentraties weefselfactor is controversieel. In onze determinantenstudie was FXII significant geassocieerd met de endogene trombinepotentiaal en de piekhoogte bij stimulatie met 1 pM weefselfactor, maar niet bij 13,6 pM. Het is echter onduidelijk of er sprake is van FXII activatie tijdens de trombinegeneratiemetingen, of dat kleine hoeveelheden FXII reeds tijdens de bloedafname worden geactiveerd. Hoewel FXIIa snel wordt gebonden aan C1-esteraseremmer zou FXI al geactiveerd kunnen zijn.

Door *corn trypsin inhibitor* aan plasma toe te voegen kan beïnvloeding van de trombinegeneratie door contactactivatie worden vermeden,<sup>26</sup> maar het was onduidelijk of het vóór de bloedafname (in de bloedafnamebuizen), tijdens de bewerking van plasma of tijdens de daadwerkelijke meting moest worden toegevoegd. Hoofdstuk 3.3 beschrijft een studie bij gezonde vrijwilligers waarin we bloedafnamemethoden varieerden en *corn trypsin inhibitor* op verschillende momenten vóór en tijdens de metingen toevoegden. Bovendien varieerden we de concentraties van de initiatoren weefselfactor en kaoline. Aan plasma toegevoegde *corn trypsin inhibitor* had alleen een significant effect op de metingen bij weefselfactor concentraties onder 0,5 pM. Wanneer *corn trypsin inhibitor* werd toegevoegd aan de afnamebuizen had het alleen een significant effect op metingen bij weefselfactor concentraties onder 1 pM. Hoewel de piekhoogte lager was in de aanwezigheid van *corn trypsin inhibitor* viel het verschil binnen de inter-assay variatie. Gezien deze resultaten en uit praktische overwegingen (waaronder de kosten van de aangepaste afnamebuizen, €15 per buis) raden we aan geen *corn trypsin inhibitor* te gebruiken wanneer de trombinegeneratietest wordt geactiveerd met 1 pM weefselfactor of meer.

Concluderend geven we de volgende aanbevelingen om te komen tot een optimale reproduceerbaarheid en vergelijkbaarheid tussen studiecentra:

1. Geen toevoeging van *corn trypsin inhibitor* aan trombinegeneratietests die worden geactiveerd met 1 pM weefselfactor of meer;
2. Gestandaardiseerde bloedafname en -bewerking, waaronder centrifugatie in twee stappen om *microparticles* uit het plasma te verwijderen;

3. Gebruik van commercieel verkrijgbare en gestandaardiseerde reagentia (waaronder fosfolipiden en initiatoren);
4. Normalisatie van tijdsonafhankelijke trombinegeneratieparameters (endogene trombinepotentiaal en piekhoogte) tegen normaalplasma.

## **Stollingsgerelateerde hypercoagulabiliteit – klinische toepassing van trombinegeneratie**

Trombinegeneratie zou een bruikbare en waardevolle methode kunnen zijn om een algemeen beeld te krijgen van de mate van stollingsactivatie in patiënten met trombose, en zou mogelijk zelfs dienst kunnen doen als risicovoorspeller. Stollingsactiviteit in plasma van patiënten is in vele studies beschreven door middel van het meten van onder andere protrombine fragment 1+2 (als een marker van de conversie van protrombine naar trombine),<sup>28-31</sup> trombine-antitrombine complexen<sup>28,32,33</sup> en D-dimeren (als een marker van de fibrinolyse volgend op trombose).<sup>28,32,33</sup>

Deze biochemische markers zijn in patiëntenstudies (over het algemeen) positief geassocieerd met het risico op myocardinfarct, herseninfarct en diepveneuze trombose, hoewel sommige studies tegenstrijdige resultaten lieten zien.<sup>9,28-34</sup> Beperkingen van deze studies zijn onder andere het retrospectieve design, het gebrek aan uitkomstparameters en de onduidelijkheid of de verhoogde stollingsactiviteit een oorzaak of gevolg is van de trombose. Onlangs verschenen enkele studies waarin spiegels van D-dimeren prospectief werden vervolgd in patiënten met diepveneuze trombose. Uit de resultaten bleek dat patiënten met voortdurend verhoogde D-dimeren een grotere kans hebben op het krijgen van een recidief.<sup>35,36</sup>

Toepassing van de trombinegeneratietest in deze patiënten was de logische volgende stap, maar er is een subtiel, maar belangrijk verschil met de bovengenoemde stollingsmarkers. Terwijl protrombine fragment 1+2, trombine-antitrombine complexen en D-dimeren *werkelijk* aanwezige stolling weerspiegelen, geeft trombinegeneratie een indicatie van de stollingsactiviteit die *mogelijk* kan ontstaan als de stollingscascade geactiveerd wordt. De endogene trombinepotentiaal correleerde zelfs omgekeerd met protrombine fragment 1+2 (in pediatrische patiënten met aangeboren hartafwijkingen),<sup>37</sup> hoewel protrombine fragment 1+2 verhoogd was in patiënten met een acuut myocardinfarct.<sup>38</sup>

In Hoofdstuk 4.1 presenteren we een studie in patiënten met een eerste acuut myocardinfarct waarbij we de waarde van de trombinegeneratietest als risicovoorspeller van het klinisch beloop beschrijven. Tijdens de acute fase van het infarct (vóór start van de behandeling) werd bloed afgenomen, en patiënten werden gevolgd gedurende een periode van 12 maanden waarbij het klinisch beloop werd vastgelegd. In overeenstemming met eerdere studies bleek het niveau van trombinegeneratie verhoogd tijdens het infarct, met een persisterend verhoogde

trombinegenratie na zes maanden. De endogene trombinepotentiaal gemeten bij presentatie was verrassend genoeg omgekeerd geassocieerd met klinische uitkomst. Patiënten met een lage endogene trombinepotentiaal hadden een grotere kans op het doormaken van een recidief infarct (myocard- en herseninfarct) en cardiovasculaire sterfte.

Deze resultaten leidden tot drie tegenstrijdige hypothesen: 1. consumptie van trombine resulterend in een verlaagde trombinegeneratiepotentieel; 2. een lage trombinegeneratierespons en een verminderde hoeveelheid trombomoduline (ten gevolge van atherosclerose) resulterend in onvoldoende activatie van het proteïne C systeem; 3. een toegenomen activiteit van eiwitten met een antistollend effect. Consumptie van trombine is echter niet erg waarschijnlijk aangezien de arteriële trombose een relatief klein en acuut proces is, in tegenstelling tot bijvoorbeeld diepveneuze trombose. Hoewel trombinegeneratie over het algemeen verhoogd was in patiënten met diepveneuze trombose in vergelijking met gezonde individuen (Hoofdstuk 4.2) zijn er geen bloedsamples afgenomen tijdens de acute fase van de trombose om consumptie van trombine aan te tonen danwel uit te sluiten. In patiënten met een acuut myocardinfarct correleerde trombinegeneratie bovendien niet met protrombine fragment 1+2, waardoor een directe link tussen *werkelijke* activatie van protrombine en *mogelijke* stollingsactiviteit niet kon worden aangetoond. Tenslotte is het mogelijk dat de trombinegeneratie verhoogd is, maar dat ook eiwitten met een antistollend effect in aantal of activiteit zijn toegenomen. Uit de determinantenstudie (Hoofdstuk 3.2) kan worden afgeleid dat met name *tissue factor pathway inhibitor* een sterk negatief (remmend) effect heeft op parameters van de trombinegeneratie. *In vitro* is aangetoond dat endotheelcellen *tissue factor pathway inhibitor* vrijmaken in de aanwezigheid van trombine.<sup>39</sup> Een herhaling van de determinantenstudie zoals beschreven in Hoofdstuk 3.2 in patiënten met een acuut myocardinfarct zou bij kunnen dragen aan een beter begrip van deze verrassende, maar interessante, resultaten.

In tegenstelling tot de resultaten verkregen in de myocardinfarctpatiënten was verhoogde trombinegeneratie geassocieerd met recidiverende diepveneuze trombose (Hoofdstuk 4.3). Hoewel de trombinegeneratie blijvend verhoogd was tijdens follow-up gedurende twee jaar, liet de laatste sample vóór het optreden van het recidief een verdere stijging zien. De toevoeging van trombomoduline aan de trombinegeneratietest resulteerde in een afgenomen reductie in plasmasamples van patiënten met een trombose in het beloop, suggestief voor trombomodulineresistentie. Terwijl trombinegeneratie in afwezigheid van trombomoduline geassocieerd was met bekende risicofactoren als resttrombose,<sup>40</sup> eerdere episode van trombose, leeftijd,<sup>41</sup> en FV Leiden,<sup>42</sup> leidde de toevoeging van trombomoduline aan de test tot een verlies van deze associaties. Trombinegeneratie met trombomoduline zou daarom een nieuwe risicofactor kunnen zijn naast deze bekende factoren.

## **Fibrinolysegerelateerde hypercoagulabiliteit – beïnvloeding van het renine-angiotensinesysteem**

Fibrinolysegerelateerde hypercoagulabiliteit in hypertensie wordt beschreven in Hoofdstuk 5.1. Het renine-angiotensinesysteem vormt de belangrijkste link tussen bloeddruk en fibrinolyse, of liever remming van de fibrinolyse.<sup>43</sup> Stimulatie van de angiotensine II receptor type-1 door angiotensine II resulteert in het vrijkomen van *plasminogen activator inhibitor type-1*, wat vervolgens leidt tot hypofibrinolyse – en een relatief verhoogde stollingsneiging.<sup>43,44</sup> Daarnaast zijn er aanwijzingen (*in vitro*) dat weefselfactor wordt opgereguleerd en tot expressie komt op het endotheeloppervlak;<sup>45</sup> dit leidt tot een verdere verstoring van het evenwicht tussen stolling en fibrinolyse. In schijnbare tegenstelling is het gegeven dat een hoge *tissue-type plasminogen activator* spiegel is geassocieerd met een verhoogd risico op arteriële trombose.<sup>46</sup> Dit is waarschijnlijk een weerspiegeling van verhoogde complexvorming door de aanwezigheid van meer *plasminogen activator inhibitor type-1* omdat het complex trager wordt geklaard dan vrij (actief) *tissue-type plasminogen activator*.<sup>47</sup>

Behandeling met bloeddrukverlagende medicatie die zijn werking ontleent aan beïnvloeding van het renine-angiotensinesysteem zou een positief effect kunnen hebben op de mate van activiteit van de fibrinolyse, en dit effect zou zelfs op kunnen treden in afwezigheid van veranderingen in de bloeddruk. Deze hypothese leidde tot een onderzoek waarin we de angiotensine II receptorantagonist eprosartan toedienden aan therapieresistente patiënten met hypertensie, in een zodanig lage dosis dat er geen bloeddrukveranderingen optraden. Deze toediening vond plaats tijdens een angiografie van de nierarterie (Hoofdstuk 5.2). Toediening van eprosartan zorgde inderdaad voor een aanzienlijke daling in *plasminogen activator inhibitor type-1* activiteit en *tissue-type plasminogen activator* antigeen, en een stijging in de activiteit van *tissue-type plasminogen activator*. Hoewel deze resultaten eerder zijn beschreven toont deze studie aan dat dit effect ook kan optreden in therapieresistente hypertensie, zonder veranderingen in de bloeddruk. Gezien deze resultaten is het verleidelijk dit type medicatie breder toe te passen bij patiënten met hoge bloeddruk, maar deze studie kijkt alleen naar effecten op de korte termijn. Bovendien is het nog onduidelijk of deze effecten zich vertalen naar een daling in de incidentie van trombotische complicaties van hoge bloeddruk.

## **Stollingsmediërende medicatie en de effecten op trombine-generatie**

Trombinegeneratie lijkt dus een bruikbare methode om potentiële stollingsactivatie te meten in patiënten, maar het is vanzelfsprekend ook gevoelig voor stollingsmediërende

medicatie. Voorbeelden hiervan zijn laag moleculair gewicht heparine (zoals beschreven in Hoofdstuk 4.1) en vitamine K antagonisten (Hoofdstuk 4.2). Een studie gericht op het in kaart brengen van stollingsbevorderende medicatie (de toediening van FVIII aan hemofilie A patiënten) wordt beschreven in Hoofdstuk 6.

Hemofilie A wordt gekarakteriseerd door verlaagde plasmaspiegels van FVIII en dit leidt tot een bloedingsneiging bij hemofilie A patiënten. Deze bloedingsneiging wordt weerspiegeld in trombinegeneratiemetingen,<sup>48,49</sup> terwijl verhoogde plasmaspiegels van FVIII een staat van verhoogde stolbaarheid aangeven.<sup>50</sup> De toediening van (procoagulant) recombinant FVIII via infusie aan hemofiliepatiënten corrigeert de verlaagde stollingsactiviteit en veroorzaakt een normalisatie van de trombinegeneratie. Het optreden van bloedingen in hemofilie A correleert met FVIII plasmaspiegels, maar er is een grote variatie tussen individuen wat er op kan wijzen dat naast FVIII nog andere componenten van de stolling van invloed zijn op het klinisch beeld. Deze observatie werd onlangs bevestigd in een aantal studies die de onderlinge relatie tussen FVIII en trombinegeneratie beschreven, waarin een grote interindividuele spreiding van de trombinegeneratie werd gevonden bij vergelijkbare FVIII plasmaspiegels.<sup>51</sup>

Onze studie waarin we trombinegeneratieparameters in kaart brachten gedurende 48 uur na toediening van recombinant FVIII bevestigde deze resultaten. Daarnaast onderzochten we de hypothese dat toevoeging van trombomoduline aan de *Calibrated Automated Thrombogram* de test gevoeliger zou maken voor FVIII, aangezien het remmende effect van trombomoduline afhankelijk is van de plasmaspiegels van FV en FVIII. Omdat het onwaarschijnlijk is dat FV grote schommelingen vertoonde tijdens de 48 uur dat het studieprotocol duurde, zou het waargenomen effect van trombomoduline voornamelijk veroorzaakt worden door verschillen in de concentratie FVIII. Multivariate regressieanalyse toonde dat de parameters die de trombinegeneratiecurve beschrijven beter de hoeveelheid FVIII weergeven wanneer trombomoduline aan de assay werd toegevoegd. Of deze techniek geschikt is om bloedingsrisico's in patiënten te schatten zal moeten blijken uit prospectieve studies.



## **Relevantie voor het meten van trombinegeneratie in een laboratoriumsetting**

Dit proefschrift beschrijft de optimalisatie, standaardisatie en medicatiegevoeligheid van de *Calibrated Automated Thrombogram*, een techniek voor het meten van trombinegeneratie, en daaruit voortvloeiende aanbevelingen ten aanzien van het afnemen en bewerken van bloedplasma, het gebruik van reagentia en het uitdrukken van de resultaten van trombinegeneratie. Daarnaast wordt de bijdrage aan trombinegeneratie van zowel pro- als anticoagulante factoren beschreven. Deze resultaten en aanbevelingen zijn een eerste aanzet tot het standaardiseren van trombinegeneratiemetingen, om zo de resultaten van verschillende laboratoria te kunnen vergelijken en (internationale) samenwerking op het gebied van trombinegeneratieonderzoek te stimuleren.

## **Relevantie van het meten van (verhoogde) stolbaarheid in de kliniek**

Dit proefschrift presenteert studies in patiënten met stollings- en fibrinolysegerelateerde verhoogde stolbaarheid, waarbij parameters van stolling en fibrinolyse werden gemeten, waaronder trombinegeneratie. De gevonden associaties tussen trombinegeneratie en klinisch beloop na arteriële en veneuze trombose dienen als een startpunt voor toekomstig onderzoek gericht op de waarde van de trombinegeneratietest voor het maken van klinische beslissingen op geleide van de individuele stolbaarheid van een patiënt. Het onderzoek gericht op beïnvloeding van het renine-angiotensinesysteem vormt een basis voor prospectieve interventiestudies die de waarde in kaart moeten brengen van een behandeling die meer gericht is op de hypercoagulabiliteit waarmee therapieresistente hypertensie gepaard gaat.

## Referenties

1. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N *et al.*; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics: 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2008;117:e25–e146.
2. Nachman RL, Silverstein R. Hypercoagulable states. *Ann Intern Med*. 1993;119:819–827.
3. Schafer AI, Levine MN, Konkle BA, Kearon C. Thrombotic disorders: diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:520–539.
4. Gaffney PJ, Edgell TA, Whitton CM. The haemostatic balance – Astrup revisited. *Haemostasis*. 1999;29:58–71.
5. Chiuve SE, McCullough ML, Sacks FM, Rimm EB. Healthy lifestyle factors in the primary prevention of coronary heart disease among men. *Circulation*. 2006;114:160–167.
6. Stampfer MJ, Hu FB, Manson JE, Rimm EB, Willett WC. Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle. *N Engl J Med*. 2000;343:16–22.
7. Seljeflot I, Hurlen M, Hole T, Arnesen H. Soluble tissue factor as predictor of future events in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Res*. 2003;111:369–372.
8. Van der Putten RF, Glatz JF, Hermens WT. Plasma markers of activated hemostasis in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta*. 2006;371:37–54.
9. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*. 2008;112:19–27.
10. Chinthammitr Y, Vos HL, Rosendaal FR, Doggen CJ. The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case-control study. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2587–2592.
11. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B *et al.* High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2000;343:457–462.
12. Legnani C, Cini M, Cosmi B, Poggi M, Boggian O, Palareti G. Risk of deep venous thrombosis: interaction between oral contraceptives and high factor VIII levels. *Haematologica*. 2004;89:1347–1351.
13. Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, Hamulyák K, van Pampus EC, Koopman MM *et al.* Elevated levels of FVIII:C within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2005;3:97–84.
14. Spronk HM, Govers-Riemslog JW, ten Cate H. The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays*. 2003;25:1220–1228.
15. Fogari R, Zoppi A. Antihypertensive drugs and fibrinolytic function. *Am J Hypertens*. 2006;19:1293–1299.
16. De Smedt E, Al Dieri R, Spronk HM, Hamulyák K, ten Cate H, Hemker HC. The technique of measuring thrombin generation with fluorogenic substrates: 1. Necessity of adequate calibration. *Thromb Haemost*. 2008;100:343–349.
17. Duchemin J, Pan-Petes B, Arnaud B, Blouch MT, Abgrall JF. Influence of the coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Haemost*. 2008;99:767–773.

18. Van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC, Kitchen S, Makris M. Between-batch variation of calibrator activity can significantly influence fluorogenic measurement of thrombin generation. *J Thromb Haemost.* 2006;4:2514–2516.
19. Van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol.* 2008;142:889–903.
20. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Negrier C, Lecompte T, Petros S *et al.* Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study. *Br J Haematol.* 2007;139:303–309.
21. Devreese K, Wijns W, Combes I, Van Kerckhoven S, Hoylaerts MF. Thrombin generation in plasma of healthy adults and children: chromogenic versus fluorogenic thrombogram analysis. *Thromb Haemost.* 2007;98:600–613.
22. Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, Zach D, Muntean W. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost.* 2006;95:772–775.
23. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R *et al.* The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32:249–253.
24. Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1954–1959.
25. Van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC, Kitchen S, Bowyer AE, Makris M. Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombin-generation measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008;19:183–189.
26. Ramström S. Clotting time analysis of citrated blood samples is strongly affected by the tube used for blood sampling. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005;16:447–452.
27. Ota S, Wada H, Abe Y, Yamada E, Sakaguchi A, Nishioka J *et al.* Elevated levels of prothrombin fragment 1+2 indicate high risk of thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2008;14:279–285.
28. Agewall S, Wikstrand J, Fagerberg B. Prothrombin fragment 1+2 is a risk factor for myocardial infarction in treated hypertensive men. *J Hypertens.* 1998;16:537–541.
29. Cooper JA, Miller GJ, Bauer KA, Morrissey JH, Meade TW, Howarth DJ *et al.* Comparison of novel hemostatic factors and conventional risk factors for prediction of coronary heart disease. *Circulation.* 2000;102:2816–2822.
30. Côté R, Wolfson C, Solymoss S, Mackey A, Leclerc JR, Simard D *et al.* Hemostatic markers in patients at risk of cerebral ischemia. *Stroke.* 2000;31:1856–1862.
31. Kyrle PA, Eichinger S, Pabinger I, Stümpflen A, Hirschl M, Bialonczyk C *et al.* Prothrombin fragment F1+2 is not predictive for recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 1997;77:829–833.
32. Lowe GD, Rumley A, Sweetnam PM, Yarnell JW, Rumley J. Fibrin D-dimer, markers of coagulation activation and the risk of major ischaemic heart disease in the Caerphilly study. *Thromb Haemost.* 2001;86:822–827.
33. Oldgren J, Linder R, Grip L, Siegbahn A, Wallentin L. Coagulation activity and clinical outcome in unstable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1059–1064.

34. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Valdres L, Lunghi B, Bernardi F *et al.* Predictive value of D-dimer test for recurrent venous thromboembolism after anticoagulation withdrawal in subjects with a previous idiopathic event and in carriers of congenital thrombophilia. *Circulation*. 2003;108:313–318.
35. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Guazzaloca G, Pancani C, Coccheri S. Risk of venous thromboembolism recurrence: high negative predictive value of D-dimer performed after oral anticoagulation is stopped. *Thromb Haemost*. 2002;87:7–12.
36. Legnani C, Palareti G, Cosmi B, Cini M, Tosetto A, Tripodi A; PROLONG Investigators (FCSA and Italian Federation of Thrombosis Centers). Different cut-off values of quantitative D-dimer methods to predict the risk of venous thromboembolism recurrence: a post-hoc analysis of the PROLONG study. *Haematologica*. 2008;93:900–907.
37. Koestenberger M, Cvirn G, Nagel B, Rosenkranz A, Leschnik B, Gamillscheg A *et al.* Thrombin generation determined by calibrated automated thrombography (CAT) in pediatric patients with congenital heart disease. *Thromb Res*. 2008;122:13–19.
38. Van der Putten RF, Glatz JF, Hermens WT. Plasma markers of activated hemostasis in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta*. 2006;371:37–54.
39. Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:233–242.
40. Young L, Ockelford P, Milne D, Rolfe-Vyson V, Mckelvie S *et al.* Post-treatment residual thrombosis increases the risk of recurrent deep vein thrombosis and mortality. *J Thromb Haemost*. 2006;4:1919–1924.
41. Baglin T, Palmer CR, Luddington R, Baglin C. Unprovoked recurrent venous thrombosis: prediction by D-dimer and clinical risk factors. *J Thromb Haemost*. 2008;6:577–582.
42. Marchiori A, Mosena L, Prins MH, Prandoni P. The risk of recurrent venous thromboembolism among heterozygous carriers of factor V Leiden or prothrombin G20210A mutation. A systematic review of prospective studies. *Haematologica*. 2007;92:1107–1114.
43. Brown NJ, Agirbasli MA, Williams GH, Litchfield WR, Vaughan DE. Effect of activation and inhibition of the renin-angiotensin system on plasma PAI-1. *Hypertension*. 1998;32:965–971.
44. Lip GY. Hypertension and the prothrombotic state. *J Hum Hypertens*. 2000;14:687–690.
45. Mehta JL, Li DY, Yang H, Raizada MK. Angiotensin II and IV stimulate expression and release of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human coronary artery endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39:789–794.
46. Goodfield NE, Newby DE, Ludlam CA, Flapan AD. Effects of acute angiotensin II type-1 receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition on plasma fibrinolytic parameters in patients with heart failure. *Circulation*. 1999;99:2983–2985.
47. Brown NJ, Kumar S, Painter CA, Vaughan DE. ACE inhibition versus angiotensin type-1 receptor antagonism: differential effects on PAI-1 over time. *Hypertension*. 2002;40:859–865.
48. Beltran-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia*. 2005;11:326–334.
49. Trossaert M, Regnault V, Sigaud M, Boisseau P, Fressinaud E, Lecompte T. Mild haemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. *J Thromb Haemost*. 2008;6:486–493.

50. Siegemund A, Petros S, Siegemund T, Scholz U, Seyfarth HJ, Engelmann J. The endogenous thrombin potential and high levels of coagulation factor VIII, factor IX and factor XI. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004;15:241–244.
51. Lewis SJ, Stephens E, Florou G, Macartney NJ, Hathaway LS, Knipping J *et al*. Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion. *Br J Hematol*. 2007;138:775–782.